

THESIS

BONN

1967

DIE BEEINFLUSSUNG DER FORMALIN-INDUZIERTEN
PROTEASENAKTIVIERUNG DURCH ANTIPHLOGISTIKA IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Zahnheilkunde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Günther Schulze
aus Niedermarsberg

Bonn 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

DIE BEEINFLUSSUNG DER FORMALIN-INDUZIERTEN
PROTEASENAKTIVIERUNG DURCH ANTIPHLOGISTIKA IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Zahnheilkunde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
G ü n t h e r S c h u l z e
aus Niedermarsberg

Bonn 1967

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent : Prof. Dr. med. K. Mörsdorf
Koreferent: Prof. Dr. med. R. Domenjoz

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. R. Domenjoz

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 5. 1967

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	5
II. Das Verhalten proteolytischer Prozesse im entzündeten Gewebe und deren Beziehung zur Intensität der entzündlichen Reaktion	
1. Methodik der Entzündungsversuche	7
2. Methodik zur Bestimmung proteolytischer Prozesse	8
3. Experimentelle Befunde	16
III. Beeinflussung der Formalin-aktivierten Proteolyse durch Pharmaka in vitro	
1. Methodik zur Beeinflussung proteoly- tischer Prozesse durch Antiphlogistika	21
2. Experimentelle Befunde	26
IV. Diskussion	35
V. Zusammenfassung	42
VI. Literaturverzeichnis	43

I. Einleitung und Problemstellung

Im entzündeten Gewebe finden Stoffwechselveränderungen statt, die für das Wesen der Entzündung von großer Bedeutung sind.

Heute wird besonders der Depolymerisierung der Grundsubstanz und der Aktivierung gewebeeigener Fermente, vor allem Esterasen und Proteasen, eine hervorragende pathogenetische Bedeutung zugesprochen.

In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Hladovec und Mitarbeitern (19, 20, 21) von Interesse, die ein vermehrtes Auftreten eines esterspaltenden Fermentes im Gewebe der Rattenpfoten bei der Kaolin-Arthritis feststellten. Die Fermentaktivierung zeigte eine Parallele zur Entzündungsintensität und ließ sich in vivo durch einen Proteaseninhibitor hemmen.

Donner konnte in Übereinstimmung mit den genannten Autoren für die Beispiele der Dextran-, Formalin- und Trypsin-bedingten Entzündung an der Ratte ebenfalls die Aktivierung eines esterspaltenden Fermentes finden. Bemerkenswerterweise gelang es auch, durch Vorbehandlung der Tiere mit Antiphlogistika diese Fermentaktivierung zu hemmen.

In ergänzenden Versuchen konnte Cornelissen nachweisen, daß die von diesem Fermentsystem vermittelte Hydrolyse von Acetyltyrosinaethylester durch verschiedene antiphlogistisch wirkende Pharmaka in vitro konzentrationsabhängig gehemmt werden kann.

Während die Beteiligung von Esterasen am Entzündungsgeschehen erst seit wenigen Jahren bekannt ist, wird eine Mittlerfunktion von Proteasen schon seit längerer Zeit diskutiert. Die durch die entzündliche Reaktion hervorgerufene Aktivierung von

Proteasen bewirkt eine Hydrolyse der Gewebsproteine zu Albumosen, Peptonen, Polypeptiden, Peptiden und Aminosäuren, von denen besonders die biologisch hochaktiven Polypeptide als Mediator für den weiteren Entzündungsablauf von Bedeutung sind.

Schon 1928 konnte Menkin (28) nach Terpentininjektion bei Hunden eine lokale Anhäufung von Aminosäuren im Lungenexsudat beobachten. Später gelang es Menkin (29), im entzündlichen Exsudat eine polypeptidartige Substanz, die er Leukotaxin nannte, nachzuweisen. Dieses Stoffwechselprodukt erhöht die Kapillarpermeabilität und wirkt leukotaktisch. Die gewonnenen Ergebnisse veranlaßten ihn, den bekannten Kardinalsymptomen der Entzündung die Proteolyse als weiteres Kriterium hinzuzufügen. Auch Ungar (37, 38) wies auf die wichtige Rolle proteolytischer Prozesse bei der Einleitung von entzündlichen Reaktionen hin.

Neuere Untersuchungen von Kalbhen sowie Kalbhen und Domenjoz zur Bedeutung der Proteolyse im Rahmen des entzündlichen Geschehens zeigten ebenfalls eine Erhöhung des Aminosäuregehaltes im Gewebe der mit Dextran, Serotonin, Formalin bzw. Trypsin entzündeten Rattenpfote. Bemerkenswert ist, daß der beobachtete Anstieg der Aminosäuren im entzündeten Gewebe im direkten Verhältnis zur Ödemgröße stand.

Eine Ergänzung dieser Befunde stellen Untersuchungen von Hardt sowie Mörsdorf (32) dar, die im Entzündungsgebiet bei der an der Rattenpfote mit Dextran ausgelösten Entzündung eine Aktivierung gewebseigener, proteolytischer Prozesse beobachten konnten, die dem Ausmaß der Schwellungsintensität nahezu parallel verlief. In vitro konnte die Dextran-induzierte Proteasenaktivierung durch Antiphlogistika konzentrationsabhängig gehemmt werden.

Uns interessierte nun, ob die von Hardt und Mörsdorf gewonnenen Beobachtungen auch für das Formalinödem zutreffen und wir führten entsprechende Untersuchungen durch, die im folgenden kurz skizziert seien.

Bei männlichen, weißen Ratten wurde durch Injektion von Formalin an der Pfote eine entzündliche Gewebsreaktion ausgelöst. Die Intensität der Entzündungsreaktion wurde in Abhängigkeit der Entzündungsdauer ermittelt.

Parallel dazu untersuchten wir in vitro die proteolytische Aktivität der aus dem entzündeten Gewebe zubereiteten Homogenate.

Wir überprüften dann, ebenfalls in vitro, die Beeinflussung dieser proteolytischen Reaktion durch verschiedene Pharmaka.

II. Das Verhalten proteolytischer Prozesse im entzündeten Gewebe und deren Beziehung zur Intensität der entzündlichen Reaktion

1. Methodik der Entzündungsversuche

Zu unseren Versuchen verwendeten wir männliche, weiße Ratten (Wistar), mit einem mittleren Gewicht von ca. 165 g. Die Tiere wurden mindestens acht Tage unter den üblichen Laboratoriumsbedingungen gehalten.

Zur Auslösung einer entzündlichen Reaktion injizierten wir den Ratten 0,1 ml einer 3%igen Formaldehydlösung subcutan in die Plantarseite der linken Hinterpfoten. Wir töteten jeweils 5 Tiere in Abständen von 10, 30, 90, 120, 240, 480 Minuten nach der Formalininjektion und amputierten beide Hinterpfoten im Tarsocruralgelenk. Die Schwellung ergab sich aus der

Gewichtsdifferenz der amputierten, gesunden und entzündeten Pfoten (Wilhelmi). Die prozentuale Änderung wurde als Schwellungsintensität bezeichnet.

Im folgenden sei ein Beispiel für unser methodisches Vorgehen aufgeführt:

Für die nach 30 Minuten getöteten Tiere erhielten wir bei Wägung der Pfoten folgende Zahlenwerte:

rechte Pfoten (NE)	linke Pfoten (E)	Diff.	Schwellungs- intensität
in mg	in mg	in mg	in %
1140	1350	210	18
1200	1440	240	20
1170	1390	220	19
1140	1380	240	21
1220	1440	220	18

Die Intensität der entzündlichen Schwellung betrug demnach bei einer Entzündungsdauer von 30 Minuten im Mittel 19 %.

2. Methodik zur Bestimmung proteolytischer Prozesse

Je 5 Pfoten, getrennt in nicht entzündete (NE) und entzündete (E), wurden mit der doppelten Menge ihres Gewichtes mit Sörensenpuffer (pH 5,5) versetzt. Die Pfoten wurden im Bühlerhomogenisator bei voller Umdrehungszahl 60 Sekunden unter Wasserkühlung zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenisiergefäß mit der Gewichtsmenge der Pfoten an Puffer nachgespült, der gewonnene Gewebsbrei durch Verbandmull abgepreßt und der Rückstand verworfen. Zur Auffüllung der Homogenate auf das gleiche Volumen wurde ebenfalls Puffer (pH 5,5) benutzt.

Für unsere Untersuchungen bedienten wir uns folgender Ansätze:

Ansatz 1 1,0 ml Homogenat (NE)
 2,0 ml Puffer (pH 5,5)
mit 3,0 ml Trichloressigsäure (TCA) 6%ig
 sofort gestoppt;
 dieser Ansatz wurde 3-fach erstellt und diente
a) zur Bestimmung der im gesunden Gewebe vor-
 handenen Proteinbruchstücke und
b) als Blank für Ansatz 2;

Ansatz 2 1,0 ml Homogenat (NE)
 2,0 ml Puffer (pH 5,5)
mit 3,0 ml TCA nach einer Inkubationsdauer von
 zwei Stunden gesäuert;
 dieser Ansatz wurde 5-fach erstellt und diente
zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität
für das nicht entzündete Gewebe;

Ansatz 3 1,0 ml Homogenat (E)
 2,0 ml Puffer
mit 3,0 ml TCA sofort gestoppt;
 dieser Ansatz wurde 3-fach erstellt und diente
a) zur Bestimmung der im entzündeten Gewebe
 vorhandenen Bruchstücke und
b) als Blank für Ansatz 4;

Ansatz 4 1,0 ml Homogenat (E)
 2,0 ml Puffer
mit 3,0 ml TCA nach einer Inkubationsdauer von
 zwei Stunden gesäuert;
 dieser Ansatz wurde 5-fach erstellt und diente
zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität
für das entzündete Gewebe;

Die vor und nach Inkubation bei den Ansätzen 2 und 4 bestimmten pH-Werte lagen im Bereich von 5,7 - 5,9 und zeigten sich durch die Inkubation nicht verändert. Dieser pH-Wert wurde gewählt, da nach Untersuchungen von Lack Gewebsproteasen im sauren Bereich ihre größte Aktivität aufweisen.

Nach der Inkubation und der erfolgten Säuerung wurden die Ansätze 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen/min zentrifugiert und der Überstand filtriert.

Die in der Trichloressigsäure gelösten Eiweißbrückstücke sind als Maß der proteolytischen Fermentaktivität zu betrachten und können spektralphotometrisch erfaßt werden; Methode nach Rick in leicht modifizierter Form.

Wir verdünnten 0,5 ml des aus unseren Ansätzen gewonnenen Filtrates mit 2,0 ml Aqua destillata in einer Quarzküvette und bestimmten die Absorption im Spektralphotometer (Modell DU 2400, der Firma Beckmann) bei einer Wellenlänge von 280 nm. An Hand einer mit Hilfe von Tyrosin erstellten Eichkurve wurden die erhaltenen Extinktionswerte auf Tyrosin bezogen. Das Ausmaß der von uns verfolgten proteolytischen Vorgänge wurde also einfach in Tyrosinäquivalenten ausgedrückt.

Wir sind uns dabei der Tatsache bewußt, daß sich im Filtrat nicht nur Tyrosin sondern viele andere Spaltprodukte der Proteolyse befinden. Für unsere Untersuchungen, bei denen es weniger um die qualitative Bestimmung der Eiweißbrückstücke als vielmehr um die Bestimmung der Proteolyse schlechthin geht, ist diese Methode vorzüglich geeignet, zumal dieses Verfahren schnell durchzuführen und hinreichend empfindlich ist.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde Tyrosin in steigenden Konzentrationen in 0,2 n Salzsäure gelöst, mit Trichlor-essigsäure versetzt und anschliessend für die verschiedenen konzentrierten Proben die Absorption spektralphotometrisch erfaßt.

Die verwendeten Tyrosinlösungen wiesen nachstehende Konzentrationen auf:

1. 250 $\mu\text{g/ml}$
2. 375 $\mu\text{g/ml}$
3. 500 $\mu\text{g/ml}$
4. 750 $\mu\text{g/ml}$
5. 1000 $\mu\text{g/ml}$
6. 1500 $\mu\text{g/ml}$

Zu unseren Messungen erstellten wir folgende Ansätze:

- 1,0 ml Tyrosinlösung
- 2,0 ml 0,2 n HCl
- 3,0 ml TCA (6%ig)

0,5 ml dieser Ansätze wurden mit 2,0 ml Aqua destillata in einer Quarzküvette verdünnt; die Lichtabsorption dieser Proben erfaßten wir im Spektralphotometer bei 280 nm.

Die Messung erfolgte gegen einen entsprechend zusammengesetzten Blank.

Im folgenden seien die Extinktionswerte für die verschiedenen Tyrosinkonzentrationen angegeben:

250 µg Tyrosin pro Ansatz	375 µg Tyrosin pro Ansatz	500 µg Tyrosin pro Ansatz
0,045	0,065	0,090
0,045	0,070	0,100
0,045	0,070	0,090
0,050	0,065	0,100
0,040	0,070	0,100
0,040	0,070	0,100
MW 0,044	0,068	0,096

750 µg Tyrosin pro Ansatz	1000 µg Tyrosin pro Ansatz	1500 µg Tyrosin pro Ansatz
0,150	0,200	0,300
0,150	0,205	0,300
0,145	0,200	0,295
0,145	0,200	0,300
0,145	0,190	0,295
0,145	0,200	0,305
MW 0,147	0,199	0,299

Aus unseren Messungen geht hervor, daß die Extinktionwerte dem Tyrosingehalt der Ansätze weitgehend proportional verlaufen.

Graphisch stellt sich die Abhängigkeit wie folgt dar (Abb. 1).

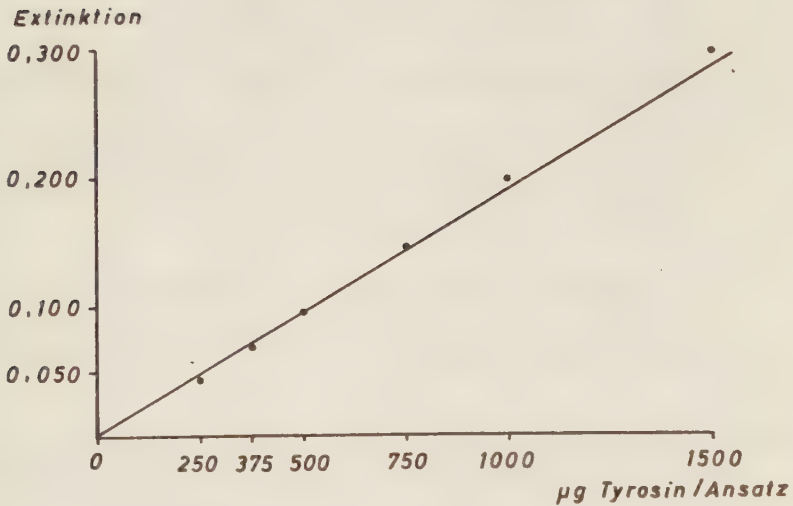


Abb. 1: Tyrosineichkurve

In unseren Untersuchungen zur Formalin-induzierten Proteasen-aktivierung erfaßten wir zwei verschiedene Fakten:

a) zunächst die nach bestimmten Zeitabständen nach der Entzündungsauslösung im gesunden und entzündeten Pfotengewebe vorhandenen Bruchstücke der Proteolyse, sowie

b) nach Inkubation die proteolytische Umsatzrate der aus gesundem und entzündetem Gewebe gewonnenen Homogenate.

Zu beiden Kriterien seien im folgenden Beispiele zur Methodik angegeben:

ad a) Im gesunden und entzündeten Pfotengewebe vorhandene Proteolysebruchstücke, ausgedrückt in Tyrosinäquivalenten, 30 Minuten nach erfolgter Formalininjektion.

Hierzu wurden die im vorhergehenden als Ansatz 1 und Ansatz 3 bezeichneten Proben verwendet; ihr Gehalt an Eiweißbruchstücken wurde bestimmt:

Nicht entz. Gewebe (NE)		Entz. Gewebe (E)	
Ext. µg Tyrosinäquival.		Ext. µg Tyrosinäquival.	
0,100	520	0,110	572
0,095	494	0,105	546
0,095	494	0,105	546
MW 0,097	503	0,107	555

Der Aufstellung kann entnommen werden, daß 30 Minuten nach der Entzündungsauslösung in dem entzündetem Gewebe mehr Eiweißbruchstücke vorhanden waren als in dem nicht entzündeten Gewebe; der Unterschied betrug 10 %.

ad b) Proteolytische Aktivität der aus gesundem und entzündetem Gewebe gewonnenen Homogenate nach erfolgter Inkubation, ausgedrückt in Tyrosinäquivalenten, für das Beispiel der Entzündungsdauer von 30 Minuten.

Hierzu wurden die im vorhergehenden als Ansatz 2 und Ansatz 4 bezeichneten Proben verwendet; das Ausmaß des während der Inkubationszeit erfaßten Proteinabbaues wurde bestimmt:

Nicht entz. Gewebe (NE)		Entz. Gewebe (E)	
Ext. µg Tyrosinäquival.		Ext. µg Tyrosinäquival.	
0,070	364	0,090	468
0,080	416	0,090	468
0,070	364	0,090	468
0,075	390	0,090	468
0,070	364	0,090	468
MW 0,073	380	0,090	468

Der Aufstellung kann entnommen werden, daß in dem aus entzündetem Gewebe gewonnenen Homogenate die Proteolyse gesteigert war; der Unterschied zu dem Homogenat aus nicht entzündetem Gewebe betrug 23 %.

3. Experimentelle Befunde

Die von uns durchgeführten Untersuchungen sollten Aufschluß geben

- a) über die Relation zwischen Entzündungsdauer und Entzündungsintensität, sowie
- b) über das Verhalten der dabei ablaufenden proteolytischen Prozesse.

a) Beziehung zwischen Entzündungsdauer und Entzündungsintensität

Unsere Ergebnisse über die Abhängigkeit der Entzündungsintensität von der Entzündungsdauer sind in der folgenden Tabelle (Tab. 1) zusammengefaßt (siehe auch Abb. 2).

Tab. 1: Ausmaß der Formalin-bedingten Schwellungsreaktion

Entz. Dauer in Min.	Mittl. Gew. der entz. Pfoten in mg	Mittl. Gew. der nicht entz. Pfoten in mg	Gewichts- differenz in mg	Schwellungs- intensität in Prozent
10	1320	1150	170	15
30	1390	1170	220	19
90	1490	1180	310	26
120	1570	1190	380	32
240	1650	1170	480	41
480	1480	1100	380	35

Aus den vorliegenden Befunden ist ersichtlich, daß die durch Formalin ausgelöste, entzündliche Schwellungsreaktion langsam einsetzte und nach 4 Stunden ihr Maximum erreichte. Acht Stunden nach Auslösung der Entzündung zeigte sich ein leichtes Abklingen der Schwellungsintensität.

b) Das Verhalten proteolytischer Prozesse im entzündeten Gewebe

Wir haben im Abschnitt Methodik schon darauf hingewiesen, daß wir in unseren Versuchen hinsichtlich des Verhaltens proteolytischer Prozesse im entzündeten Gewebe zwei verschiedene Fakten berücksichtigt haben. Einerseits interessierte uns, ob in Abhängigkeit der Entzündungsdauer Unterschiede im Gehalt an Proteinbruchstücken für entzündetes und nicht entzündetes Gewebe vorliegen, andererseits bemühten wir uns, die proteolytische Umsatzrate für aus entzündetem und nicht entzündetem Gewebe gewonnene Homogenate nach Inkubation zu erfassen.

Unsere Versuchsergebnisse hinsichtlich der in den Geweben bei verschiedener Dauer der Formalin-induzierten Entzündung ange- troffenen Proteinbruchstücke sind in der Tab. 2 dargestellt (siehe auch Abb. 2).

Tab. 2: Im Gewebe vorhandene Proteolysebruchstücke

Entz.- Dauer in Min.	Eiweißbruchstücke in μ g Tyrosin		Differenz in μ g	Unterschied in Prozent
	NE	E		
10	503	563	60	+ 12
30	503	555	52	+ 10
90	546	589	43	+ 8
120	494	641	147	+ 23
240	390	555	165	+ 42
480	468	581	113	+ 24

Für das mit Formalin entzündete Gewebe konnten wir in jeder Versuchsgruppe im Vergleich zu dem nicht entzündeten Gewebe eine Zunahme der Proteolysebruchstücke feststellen. Diese erwies sich von der Entzündungsdauer abhängig. Die maximale

Anhäufung von Eiweißspaltprodukten im entzündeten Gewebe, die als Ausdruck einer gesteigerten Proteolyse gewertet werden kann, fanden wir bei einer Entzündungsdauer von 4 Stunden. Zu einem späteren Zeitpunkt, acht Stunden nach der Entzündungsauslösung, hatte das Ausmaß der proteolytischen Aktivität wieder etwas abgenommen. Es ergab sich somit zwischen der Schwellungsintensität und dem Auftreten von Proteolysebruchstücken im entzündeten Gewebe ein annähernd paralleles Verhalten, wie dies in der Abb. 2 graphisch zum Ausdruck gebracht wird.

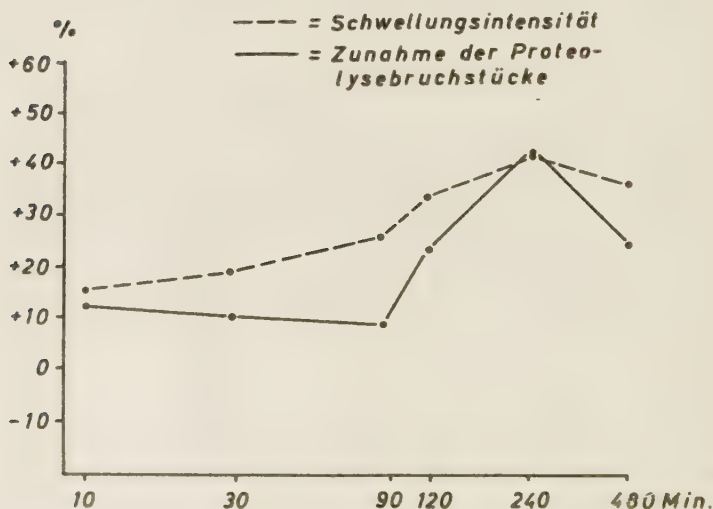


Abb. 2: Verhältnis zwischen Schwellungsintensität und Zunahme der Proteolysebruchstücke im entzündeten Gewebe

Im folgenden seien unsere Versuchsergebnisse aufgeführt, die Aufschluß geben über die proteolytische Umsatzrate für Homogenate aus entzündetem und nicht entzündetem Gewebe bei verschiedener Entzündungsdauer. Einen Überblick über die von uns festgestellten Verhältnisse gibt die Tab. 3.

Tab. 3: Proteolytische Aktivität der untersuchten Homogenate

Entz.- Dauer in Min.	Eiweißbruchstücke		Differenz in μg	Änderung der proteol. Umsatzrate für entz. Gewebe in Prozent
	in μg Tyrosin NE	E		
10	478	426	52	- 11
30	380	468	88	+ 23
90	411	463	52	+ 13
120	369	546	177	+ 48
240	359	556	197	+ 55
480	432	556	124	+ 29

Im allgemeinen fanden wir für die Homogenate aus entzündetem Gewebe eine gesteigerte Proteolyse. Die Zunahme proteolytischer Prozesse gegenüber Homogenaten aus nicht entzündetem Pfortengewebe zeigte eine Abhängigkeit von der Entzündungsdauer. Die maximale Steigerung der proteolytischen Umsatzrate für entzündetes Gewebe erfaßten wir bei einer Entzündungsdauer von vier Stunden. Zum acht-Stunden-Wert war das Ausmaß der proteolytischen Aktivität wieder geringer.

In der folgenden Abbildung (Abb. 3) sind der Verlauf der Schwellungsintensität und das Verhalten der proteolytischen Aktivität im entzündeten Gewebe während der Inkubationszeit graphisch dargestellt.

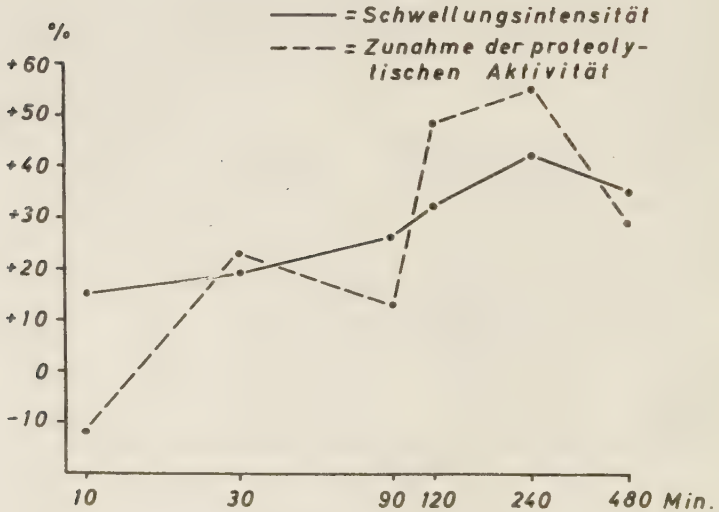


Abb. 3: Verhältnis zwischen Schwellungsintensität und Zunahme der proteolytischen Aktivität im entzündeten Gewebe während der Inkubationszeit

Wie ersichtlich, läuft die Schwellungsintensität mit der proteolytischen Aktivität weitgehend parallel. Beide haben ihr Maximum nach vier Stunden. Wir können diesen Ergebnissen entnehmen, daß Schwellungsintensität und proteolytische Aktivität in direkter Beziehung zueinander stehen. Mit zunehmender Entzündungsdauer erfahren die im entzündeten Gewebe ablaufenden proteolytischen Prozesse bis zu einem Maximum, das bei vier Stunden nach der Formalinverabreichung liegt, eine Aktivierung.

III. Die Beeinflussung der Formalin-aktivierten Proteolyse durch Pharmaka in vitro

In der vorausgegangenen Versuchsserie kamen wir zu dem Ergebnis, daß die im entzündeten Gewebe stattfindenden proteolytischen Prozesse vier Stunden nach der Entzündungsauslösung maximal aktiviert sind.

Weitere Versuche sollten nun zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit diese Formalin-aktivierte Proteolyse durch Pharmaka zu beeinflussen ist.

1. Methodik zur Beeinflussung proteolytischer Prozesse durch Antiphlogistika

Die Entzündungsauslösung erfolgte mit 0,1 ml einer 3%-igen Formaldehydlösung, die jeweils 5 Ratten subplantar in beide Hinterpfoten injiziert wurde. Wir töteten die Tiere vier Stunden nach erfolgter Formalininjektion, da in unseren vorausgegangenen Versuchen das Homogenat, der von diesen Tieren stammenden Pfoten, die größte proteolytische Aktivität zeigte und uns daher zur Beeinflussung durch Pharmaka am besten geeignet erschien. Die weitere Aufbereitung erfolgte so, wie oben eingehend beschrieben.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in Sörensen-Puffer (pH 5,5) gelöst. Im Falle einer Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration stellten wir den ursprünglichen pH-Wert durch Zugabe von 1 n NaOH oder 1 n HCl wieder her.

Zur Bekräftigung unserer Ergebnisse führten wir alle Untersuchungen 2-fach durch, d.h. wir machten unsere Versuche jeweils an zwei getrennten Kollektiven von 5 Tieren, die dem gleichen Stamm und der gleichen Zulieferung angehörten. Ebenso setzten wir die Lösungen der zu untersuchenden Prüfsubstanzen für beide Versuche getrennt an.

Eine Versuchsreihe enthielt vier Ansatzserien:

- Ansatz 1 1,0 ml Homogenat
 2,0 ml Puffer (pH 5,5)
mit 3,0 ml TCA sofort gestoppt;
 diese Ansatzserie wurde 3-fach erstellt und
 diente als Blank für Ansatz 2;
- Ansatz 2 1,0 ml Homogenat
 2,0 ml Puffer (pH 5,5)
mit 3,0 ml TCA nach zwei Stunden Inkubation
 gesäuert;
 diese Ansatzserie wurde 5-fach erstellt und
 diente zur Bestimmung der unbeeinflussten,
 normalen proteolytischen Aktivität im entzündeten Gewebe;
- Ansatz 3 1,0 ml Homogenat
 2,0 ml Puffer (den Effektor in verschiedenen
 Konzentrationen enthaltend)
mit 3,0 ml TCA sofort gestoppt;
 diese Ansatzserie wurde 3-fach erstellt und
 diente als Blank für Ansatz 4;
- Ansatz 4 1,0 ml Homogenat
 2,0 ml Puffer (den Effektor in verschiedenen
 Konzentrationen enthaltend)
mit 3,0 ml TCA nach zwei Stunden Inkubation
 gesäuert;
 diese Ansatzserie wurde 5-fach erstellt und
 diente zur Bestimmung der proteolytischen
 Aktivität unter Einfluß der Prüfsubstanzen;

Alle Proben wurden im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C zwei Stunden lang inkubiert.

Die vor und nach Inkubation bei den Ansatzserien 2 und 4 bestimmten pH-Werte lagen im Bereich von 5,7 - 5,9 und zeigten sich durch die Inkubation nicht verändert.

Nach Säuerung wurden alle Ansatzserien 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen/min zentrifugiert und der Überstand filtriert.

Zur Messung brachten wir 1,0 ml des Filtrates + 1,5 ml Aqua destillata. Die Extinktionswerte, die auf μg Tyrosin pro Ansatz bezogen wurden, galten als Maß für die während der Inkubationszeit erfolgte Proteolyse.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir folgende Prüfsubstanzen:

a) aus der Reihe der Antipyretika-Analgetika:

Oxyphenbutazon	Endkonz.	10, 20 und 40 mg%
Phenylbutazon ⁺	"	10, 20 und 40 mg%
Natriumsalicylat	"	10, 50 und 100 mg%
Acetylsalicylsäure	"	10, 50 und 100 mg%
Aminophenazon	"	10, 50 und 100 mg%

b) aus der Reihe neuerer Antiphlogistika:

Indometacin	Endkonz.	10, 50 und 100 mg%
Naftipramid	"	10, 50 und 100 mg%
Flufenamsäure ⁺⁺	"	10, 50 und 100 mg%
Mefenamsäure ⁺⁺	"	10, 50 und 100 mg%

c) aus der Reihe der Analgetika:

Morphin-Hydrochlorid	Endkonz.	10, 50 und 100 mg%
Ketobemidon	"	10, 50 und 100 mg%

d) aus der Reihe der Hormone:

Cortisonacetat (als Suspension)	Endkonz.	10, 50 und 100 mg%
------------------------------------	----------	--------------------

e) ferner:

Epsilon-Aminocapronsäure	Endkonz.	10, 50 und 100 mg%
Trasylo ^R	"	100, 500 und 1000 K.I.E./ml
Dimethylsulfoxyd	"	1,4 7,0 und 14,0 %
Histamin-Dichlorid		10, 50 und 100 mg%
Serotonin-Creatininsulfat ⁺⁺⁺		10, 50 und 100 mg%

⁺ In der stärksten Konzentration fiel Phenylbutazon zu einem geringen Teil in den Ansätzen aus. Nach Domenjoz (7) liegt die Löslichkeit von Phenylbutazon im pH-Bereich von 6,0 bei 34,5 mg%

⁺⁺ Wegen der sehr geringen Löslichkeit von Flufenamsäure und Mefenamsäure wurden diese in einer Traganthsuspension benutzt.

⁺⁺⁺ Die angegebenen Konzentrationswerte beziehen sich auf die Base.

Unser methodisches Vorgehen für die Beeinflussung der proteolytischen Prozesse sei an einem Beispiel geschildert:

Prüfsubstanz: Oxyphenbutazon

1. Meßergebnisse für die während der Inkubation unbeeinflusste Proteolyse (also ohne Oxyphenbutazon), ausgedrückt in Tyrosin-äquivalenten = Leeransatz zur Bestimmung der vollen proteolytischen Aktivität:

Extinktion	μg Tyrosin/Ansatz
0,170	884
0,160	832
0,165	858
0,165	858
0,165	858
MW 0,165	858

Der mittlere Wert von 858 μg Tyrosin/Ansatz gilt als Maß für die volle, unbeeinflusste proteolytische Aktivität, die wir mit 100 bezeichnen.

2. Beeinflussung durch Oxyphenbutazon in einer Endkonzentration von 10 mg%:

Extinktion	μg Tyrosin/Ansatz
0,125	650
0,130	676
0,130	676
0,135	702
0,125	650
MW 0,129	671

Der mittlere Wert von 671 μg Tyrosin/Ansatz weist zur unbeeinflussten Proteolyse eine Differenz von 187 μg Tyrosin auf, d.h.: in einer Endkonzentration von 10 mg% vermag Oxyphenbutazon die Proteolyse um - 22 % zu beeinflussen.

2. Experimentelle Befunde

Im folgenden seien unsere Versuchsergebnisse besprochen.

Für die Prüfsubstanzen aus der Reihe Antipyretika-Analgetika ergaben sich die in Tab. 4 zusammengefaßten Befunde.

Tab. 4: Beeinflussung der in vitro erfolgten Proteolyse

Effektor	Konzentration in mg%	Beeinflussung der Proteolyse in Prozent		Mittlere Beeinflussung in Prozent
		1. Serie	2. Serie	
Oxyphen- butazon	10	- 22	- 25	- 24
	20	- 28	- 29	- 29
	40	- 53	- 49	- 51
Phenyl- butazon	10	- 24	- 36	- 30
	20	- 49	- 49	- 49
	40	- 55	- 59	- 57
Natrium- salicylat	10	- 63	- 69	- 66
	50	- 78	- 80	- 79
	100	- 88	- 89	- 89
Acetyl- salicyl- säure	10	- 20	- 19	- 20
	50	- 56	- 56	- 56
	100	- 72	- 87	- 80
Amino- phenazon	10	- 9	- 6	- 7
	50	- 18	- 23	- 21
	100	- 50	- 50	- 50

Alle von uns getesteten Antipyretika-Analgetika bewirkten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proteolyse, wobei sich für die einzelnen Substanzen quantitative Unterschiede erfassen ließen. Die stärkste Beeinflussung der Eiweißspaltung zeigte

Natriumsalicylat, das in unseren Ansätzen bei einer Endkonzentration von 100 mg% zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Proteolyse führte. Die starke Wirkung von Natriumsalicylat geht auch aus der Tatsache hervor, daß diese Verbindung selbst in einer Endkonzentration von 10 mg% eine deutliche Hemmung der proteolytischen Spaltungsvorgänge bewirkte.

Bemerkenswert ist, daß Acetylsalicylsäure in ähnlicher Weise wie Natriumsalicylat bei einer Endkonzentration von 100 mg% die Eiweißhydrolyse maximal beeinflusste. Im Gegensatz zu Natriumsalicylat konnten wir jedoch für Acetylsalicylsäure bei einer Endkonzentration von 10 mg% lediglich eine geringe Hemmwirkung feststellen.

Die beiden Pyrazolonderivate, das Phenylbutazon und dessen Abbauprodukt, das Oxyphenbutazon, führten in Endkonzentrationen von 40 mg% zu einer deutlichen Proteolysehemmung. Auch für schwächere Endkonzentrationen bis 10 mg% ließ sich eine derartige Wirkung deutlich nachweisen, wobei sich in den schwächeren Konzentrationen das Phenylbutazon dem Oxyphenbutazon leicht überlegen zeigte.

Aminophenazon, das im niedrigen Konzentrationsbereich die Eiweißspaltung nur schwach beeinflusste, zeigte in stärkster Konzentration mit 50 % ebenfalls einen beachtlichen Hemmeffekt. Zur besseren Übersicht seien unsere Befunde mit den Prüfsubstanzen aus der Reihe der Antipyretika-Analgetika in einer Abbildung (Abb. 4) graphisch dargestellt.

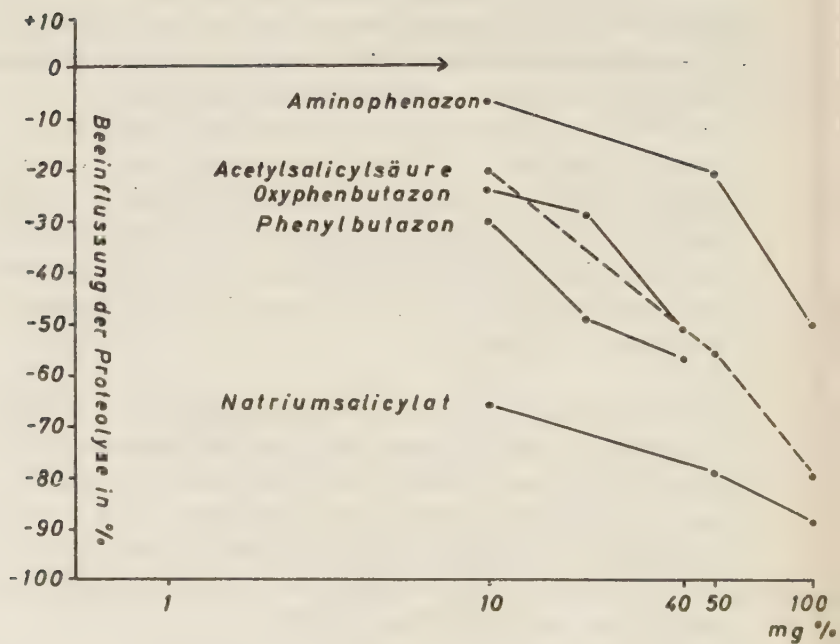


Abb. 4: Beeinflussung der Proteolyse durch verschiedene Antiphlogistika

Für die von uns untersuchten neueren Antiphlogistika, Indometacin, Naftipramid, Flufenam- und Mefenamsäure konnten wir die in Tab. 5 zusammengefaßten Befunde erheben.

Tab. 5: Beeinflussung der in vitro erfolgten Proteolyse

Effektor	Konzentration in mg%	Beeinflussung der Proteolyse in Prozent		Mittlere Beeinflussung in Prozent
		1. Serie	2. Serie	
Indo- metacin	10	- 38	- 35	- 37
	50	- 57	- 62	- 60
Nafti- pramid	10	- 10	- 13	- 12
	50	+ 7	+ 10	+ 9
Flufenam- säure	10	- 61	- 59	- 60
	50	- 64	- 68	- 66
	100	- 69	- 72	- 71
Mefenam- säure	10	- 5	- 3	- 4
	50	- 9	- 8	- 9
	100	- 11	- 22	- 17

Anmerkung: Die hohe Eigenabsorption von Indometacin und Naftipramid in der Konzentration von 100 mg% führte zu starken Schwankungen der Extinktionswerte, was eine genaue Auswertung der Ergebnisse nicht zuließ; auf deren Darstellung wurde deshalb verzichtet.

Indometacin und Flufenamsäure zeigten auch in den schwächeren Konzentrationen eine starke Hemmung der proteolytischen Aktivität. Die Wirkungsstärke von Flufenamsäure lag nahezu gleich mit derjenigen von Natriumsalicylat. Es ist also auffallend, daß auch für dieses Beispiel bei einer Endkonzentration von 10 mg% noch eine sehr deutliche Hemmung der hydrolytischen Abbauvorgänge beobachtet werden konnte.

Die Prüfsubstanzen Naftipramid und Mefenamsäure erwiesen sich als kaum wirksam auf die Proteolyse. Auffallend war bei den Untersuchungen mit Naftipramid, daß diese Verbindung in der geringeren Konzentration die Tendenz einer Hemmung, in der höheren Konzentration hingegen aber die Tendenz einer Steigerung der in vitro ablaufenden proteolytischen Prozesse zeigte.

Die von uns erhobenen Befunde werden mit der Abb. 5 verdeutlicht.

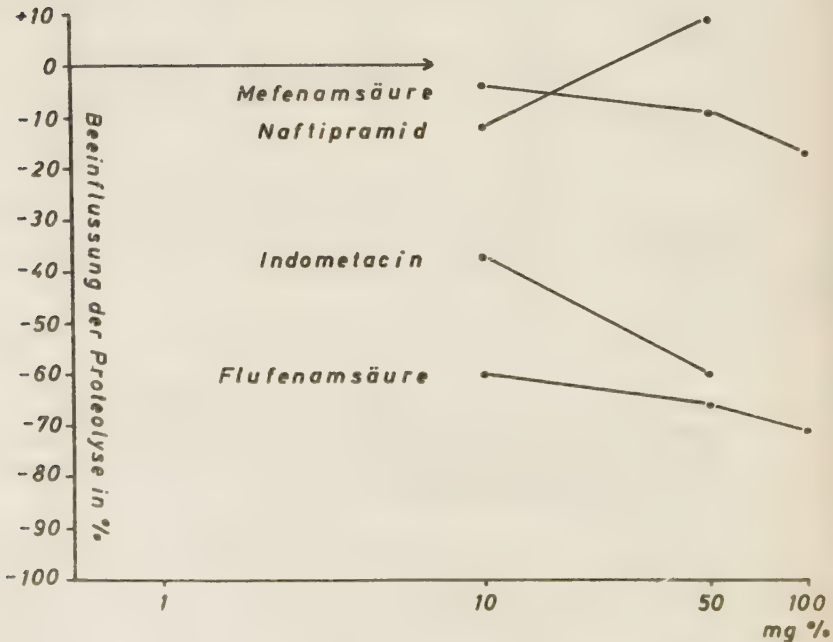


Abb. 5: Beeinflussung der Proteolyse durch neuere Anti-phlogistika

In der folgenden Tabelle (Tab. 6) seien unsere mit Cortison-acetat, Morphin-Hydrochlorid und Ketobemidon erzielten Versuchsergebnisse zusammen dargestellt.

Tab. 6: Beeinflussung der in vitro erfolgten Proteolyse

Effektor	Konzentration in mg%	Beeinflussung der Proteolyse in Prozent		Mittlere Beeinflussung in Prozent
		1. Serie	2. Serie	
Cortison- acetat	10	- 7	0	- 4
	50	- 12	- 6	- 9
	100	- 13	- 9	- 11
Morphin- Hydrochlorid	10	- 3	0	- 2
	50	- 10	- 10	- 10
	100	- 18	- 18	- 18
Ketobemidon	10	- 6	- 6	- 6
	50	- 10	- 11	- 11
	100	- 13	- 15	- 14

Cortisonacetat zeigte in keinem Konzentrationsbereich einen Einfluß auf die proteolytischen Spaltungsvorgänge. Es steht damit im Gegensatz zu anderen klinisch gut wirksamen Anti-phlogistika. Wie aus der Tabelle hervorgeht, bewirkten auch die Analgetika Morphin und Ketobemidon keine wesentliche Hemmung der Proteolyse.

Über die Wirkung von Epsilon-Aminocapronsäure, Trasylol^R und Dimethylsulfoxyd auf die proteolytische Aktivität gibt die folgende Tabelle (Tab. 7) Aufschluß.

Tab. 7: Beeinflussung der in vitro erfolgten Proteolyse

Effektor	Konzentration	Beeinflussung der Proteolyse in Prozent		Mittlere Beeinflussung in Prozent
		1. Serie	2. Serie	
Epsilon-Aminocapronsäure	10 mg%	- 3	- 1	- 2
	50 mg%	+ 1	- 1	0
	100 mg%	0	+ 1	+ 1
Trasylol ^R	100 K.I.E.	+ 1	+ 2	+ 2
	500 K.I.E.	- 6	- 1	- 4
	1000 K.I.E.	- 17	- 11	- 14
Dimethylsulfoxyd	1,4 V%	- 8	- 9	- 9
	7,0 V%	- 15	- 13	- 14
	14,0 V%	- 23	- 24	- 24

Epsilon-Aminocapronsäure erwies sich als völlig unwirksam auf die proteolytische Reaktion in vitro. Trasylol^R und Dimethylsulfoxyd zeigten, zumindest in den höheren Konzentrationen eine leichte Einschränkung des Eiweißabbaues, die für das Beispiel Dimethylsulfoxyd weitgehend unspezifisch sein dürfte.

Die biogenen Amine Histamin und Serotonin zeigten eine stark unterschiedliche Beeinflussung der Proteolyse, wie aus der Tabelle 8 und der Abbildung 6 hervorgeht.

Tab. 8: Beeinflussung der in vitro erfolgten Proteolyse

Effektor	Konzentration in mg%	Beeinflussung der Proteolyse in Prozent		Mittlere Beeinflussung in Prozent
		1. Serie	2. Serie	
Histamin	10	- 1	+ 2	+ 1
	50	+ 1	0	+ 1
	100	- 5	- 5	- 5
Serotonin	10	- 11	0	- 6
	50	- 25	- 32	- 29
	100	- 88	- 99	- 94

Überraschender Weise konnten wir mit Serotonin in der Endkonzentration von 100 mg% eine nahezu vollständige Hemmung der proteolytischen Spaltungsvorgänge erzielen. Der Effekt war stark konzentrationsabhängig. Wir konnten zwar bei einer Endkonzentration von 50 mg% noch eine deutliche Hemmwirkung beobachten, vermißten diesen Effekt jedoch bei der Endkonzentration von 10 mg% vollständig. Serotonin unterscheidet sich damit von Natriumsalicylat, mit dem es in der Wirkungsstärke bei der höchsten Endkonzentration verglichen werden kann. Für das ebenfalls gewebseigene Histamin konnten wir in vitro keine Beeinflussung der Proteolyse feststellen.



Abb. 6: Beeinflussung der Proteolyse durch Histamin und Serotonin

IV. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen dienten dem Ziel, die in dem entzündeten Gewebe ablaufenden proteolytischen Vorgänge etwas näher zu verfolgen. Uns interessierte in erster Linie, ob eine Relation zwischen der Schwellungsintensität und dem Ausmaß einer Proteasenaktivierung besteht.

Aus unseren Versuchsergebnissen, die an der Formalinentzündung gewonnen wurden, ging zunächst hervor, daß die entzündliche Gewebsreaktion nach der Formalinverabreichung sehr langsam einsetzte. Das Maximum der Schwellungsintensität wurde erst nach 240 Minuten erreicht; nach 480 Minuten war bereits ein deutliches Abklingen der Schwellungsreaktion zu erkennen.

Für das mit Formalin entzündete Pfotengewebe konnten wir gegenüber dem nicht entzündeten Gewebe eine beachtliche Zunahme an Eiweißbruchstücken feststellen. Diese Veränderung erwies sich direkt abhängig von dem Ausmaß der Entzündungsreaktion.

Diese Ergebnisse stehen weitgehend in Einklang mit den Befunden von Kalbhen (22) sowie Kalbhen und Domenjoz (23) die für das Beispiel der Dextran-, Serotonin-, Trypsin- und Formalinentzündung eine Anreicherung freier Aminosäuren im entzündlich veränderten Gewebe nachweisen konnten. Im Falle des Formalinödems wurde das Maximum des Aminosäureanstiegs 90 Minuten nach der Auslösung der Entzündung, dem ungefähren Maximum der Schwellungsreaktion beobachtet.

Das Auftreten von freien Aminosäuren bzw. von Bruchstücken der Eiweißhydrolyse im entzündeten Gewebe kann eindeutig auf eine Steigerung proteolytischer Abbauvorgänge zurückgeführt werden. Das geht aus unserer zweiten Versuchsreihe hervor,

bei der wir aus gesunden und mit Formalin entzündeten Pfoten Homogenate herstellten und diese auf ihre proteolytische Aktivität untersuchten. In Abhängigkeit der Entzündungsdauer konnten wir für diese Homogenate eine gesteigerte proteolytische Aktivität nachweisen. Die proteolytische Umsatzrate war für das Homogenat am größten, das aus dem Gewebe mit der stärksten Entzündungsreaktion, i.e. vier Stunden nach der Formalinverabreichung gewonnen wurde. Ähnliche Ergebnisse für das Beispiel der experimentellen Dextranentzündung erzielten Mörsdorf (32) und Hardt. Die genannten Autoren beobachteten eine Aktivierung proteolytischer Abbauvorgänge, die dem Ausmaß der Dextranreaktion weitgehend parallel verlief, zeitlich gesehen aber leicht gegeneinander verschoben war, wobei das Maximum der Proteasenaktivierung etwas später auftrat als das der Schwellungsreaktion.

In weiteren Experimenten versuchten wir zu klären, ob die durch den Entzündungsprozess gesteigerte Proteolyse durch Antiphlogistika und andere uns interessierende Substanzen beeinflusst werden kann.

Wir verwendeten Gewebshomogenate von Rattenpfoten nach einer Entzündungsdauer von vier Stunden, die, wie im Vorhergehenden geschildert, eine starke proteolytische Umsatzrate aufwiesen. Dabei konnten wir grundsätzlich feststellen, daß Testsubstanzen mit einer spezifisch antiphlogistischen Wirkung zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der proteolytischen Aktivität führten, während unspezifisch antiphlogistisch wirksame Stoffe einen derartigen Effekt weitgehend vermissen ließen.

Ähnliche Versuche wurden von Hardt und Mörsdorf (32) für die Beeinflussung der Dextran-induzierten Aktivierung proteolytischer Prozesse vorgenommen.

In der folgenden Aufstellung sind die wesentlichsten Ergebnisse beider Versuchsreihen übersichtshalber gegenübergestellt.

Effektor	Beeinflussung der Dextran-aktivierten Proteolyse ⁺		Beeinflussung der Formalin-aktivierten Proteolyse	
	Konzentration in mg%	Hemmung in Prozent	Konzentration in mg%	Hemmung in Prozent
Oxyphenbutazon	10	34	10	24
	50	67	40	51
Phenylbutazon	20	31	20	49
	40	41	40	57
Natrium- salicylat	50	60	50	79
	100	78	100	89
Acetyl- salicylsäure	50	68	50	56
	100	93	100	80
Aminophenazon	50	26	50	21
	100	12	100	50

⁺ Hemmwerte für das Dextranödem nach Hardt

Wie aus dieser Gegenüberstellung hervorgeht, zeigten die hier aufgeführten Prüfsubstanzen aus der Reihe der Antipyretika-Analgetika für beide Beispiele der aktivierten Proteolyse im wesentlichen den gleichen Hemmeffekt. Lediglich Aminophenazon ließ in der Konzentration von 100 mg% eine stärkere Differenz erkennen.

Mit Phenylbutazon und Natriumsalicylat konnte Mörsdorf (31) auch eine Hemmung der nichtaktivierten Eigenproteolyse erzielen; die jedoch weniger stark war, als die in unseren Versuchen beobachtete Einschränkung der Eiweißspaltung. Zu bemerken wäre, daß die Untersuchungen von Mörsdorf bei einem pH-Wert von 7,2 durchgeführt wurden, während wir, entsprechend dem Reaktionsoptimum der Gewebsproteasen, in leicht saurem Milieu arbeiteten.

Eine deutliche Parallele zu unseren Ergebnissen weisen weiterhin Befunde von Cornelissen sowie Mörsdorf (32) auf. Die genannten Autoren untersuchten die Wirkung einer Reihe von Pharmaka auf ein esterspaltendes Enzymsystem, das bei entzündlichen Gewebsreaktionen aktiviert wird. Für das Beispiel der Fermentaktivierung durch Formalin gelang es, die Hydrolyse von Acetyltyrosinäthylester (ATEE) zu beeinflussen. Mit den Substanzen Natriumsalicylat, Aminophenazon, Phenylbutazon und Oxyphenbutazon konnte in vitro konzentrationsabhängig eine nahezu vollständige Hemmung der ATEE-Spaltung erzielt werden; hierbei waren Phenylbutazon und Oxyphenbutazon noch in einer Endkonzentration von 1 mg% deutlich wirksam.

Die von uns in vitro beobachtete Beeinflussung des Proteinabbaues, sowie die Befunde über die Hemmung der Eigenproteolyse und die Hemmung esterolytischer Prozesse durch verschiedene Antiphlogistika aus der Reihe der Antipyretika-Analgetika stehen weitgehend auch in Einklang mit der in vivo festgestellten Hemmwirkung dieser Substanzen gegenüber experimentell ausgelösten Entzündungen (Büch (1,2), van Cauwenberge, Domenjoz (6), Domenjoz und Mitarbeiter (8, 9, 10), Donner, Kelemen, Lapière und Mitarbeiter, Theobald, Wilhelmi und Pulver, Winter).

Von den neueren Antiphlogistika Indometacin, Naftipramid, Flufenam- und Mefenamsäure zeigten in unseren Versuchen lediglich Indometacin und Flufenamsäure eine starke Reduktion der proteolytischen Abbauvorgänge. Diese Ergebnisse stehen mit den Untersuchungen von Hardt bei der Dextran-aktivierten Proteolyse weitgehend in Einklang. Auch Mörsdorf (31) konnte mit Indometacin eine deutliche Hemmung der Eigenproteolyse nachweisen, während Naftipramid in diesen, ebenso wie in unseren Versuchen, wirkungslos war. Im Gegensatz dazu steht für Naftipramid die Wirkung auf die ATEE-Hydrolyse, die nach Cornelissen sowie Mörsdorf (32) konzentrationsabhängig, aber nahezu vollständig gehemmt werden kann. Diese Wirkung gegenüber der ATEE-Spaltung zeigte sich auch für die Prüfsubstanzen Indometacin, Flufenam- und Mefenamsäure in gleicher Art.

Die entzündliche Schwellungsreaktion nach Formalin wird durch die neueren Antiphlogistika im Gegensatz zu den antiphlogistisch wirksamen Stoffe aus der Reihe der Antipyretika-Analgetika in vivo nicht einheitlich beeinflusst.

Während Winter sowie Domenjoz und Mörsdorf (8) für Indometacin und Flufenamsäure keine Beeinflussung der Formalin-bedingten Entzündungsreaktion feststellen konnten, erwies sich nach Untersuchungen von Casadio und Mitarbeitern sowie Domenjoz und Mörsdorf das Naftipramid bei dieser Entzündungsart gut wirksam.

Die Analgetika Morphin und Ketobemidon schränkten in unseren Untersuchungen die proteolytische Aktivität nur unwesentlich ein. Zu den gleichen Ergebnissen kam Cornelissen für die Wirkung dieser Substanz hinsichtlich der ATEE-Hydrolyse. In vivo zeigen diese Pharmaka interessanterweise eine deutliche Hemmwirkung gegenüber dem Formalinödem (Gross, Theobald, Domenjoz (6), Domenjoz und Mitarbeiter (9), Weis).

Das Nebennierenrindenhormon Cortison weist gegenüber experimentellen Entzündungen ebenfalls nur eine geringe antiphlogistische Wirkung auf (Gross, Lapière und Mitarbeiter, Parkes und Wrigley, Theobald, Weis).

Auch wir konnten für Cortison keine Beeinflussung des Proteinabbaues feststellen.

Epsilon-Aminocapronsäure, der ein hemmender Einfluß auf proteolytische Vorgänge zugeschrieben wird, zeigte in unseren Versuchen keine Wirkung. Im Gegensatz dazu konnte Hardt bei der Dextran-aktivierten Proteolyse in einer Dosierung von 100 mg% eine leichte Hemmung der Proteolyse nachweisen.

Der spezifische Kallikreinantagonist Trasylol^R (Schulz) zeigte in einer Endkonzentration von 1000 K.I.E. lediglich eine geringe Hemmung der Proteinspaltung. Dies stimmt weitgehend überein mit Cornelissen, der mit Trasylol^R keine wesentliche Beeinflussung der ATEE-Hydrolyse beobachten konnte. Von Kaller wird diesem Kallikreinantagonisten allerdings eine inhibitorische Wirkung bei verschiedenen experimentellen Entzündungsformen zugeschrieben.

Dimethylsulfoxyd (DMSO) zeigte bei unseren, wie auch in den Versuchen von Hardt, nur eine schwache Hemmung der proteolytischen Abbauprozesse, ein Effekt, der wohl als unspezifisch anzusehen ist.

Interessanterweise konnten wir mit Serotonin, das einerseits vielfach als Mediator in der Genese entzündlicher Veränderungen angesehen wird, dem andererseits aber lediglich eine sekundäre Rolle bei entzündlichen Prozessen zuerkannt wird (Mörsdorf 30), eine nahezu vollständige Einschränkung der Formalin-induzierten Proteolyse nachweisen. Nach Franchimont und Mitarbeitern ist Serotonin in vivo in der Lage, das Forma-

linödem zu hemmen, während es beim Dextranödem diese Wirkung vermissen ließ. Jedoch wird von Georges und Herold sowie Garattini und Mitarbeitern berichtet, daß Serotonin auch beim Dextranödem eine Hemmung der entzündlichen Schwellungsreaktion bewirkt.

Aus unseren Versuchsergebnissen hinsichtlich der Beeinflussung einer Fermentreaktion, die bei entzündlichen Gewebsveränderungen eine deutliche Aktivierung erfährt, sowie aus den in der Literatur niedergelegten Befunden über die Beeinflussung esterolytischer Prozesse, die ebenfalls unter dem Ablauf der Entzündung aktiviert werden, läßt sich erkennen, daß die Hemmung dieser Fermentreaktionen durch Antiphlogistika weitgehend parallel verläuft mit der in vivo zu beobachtenden Potenz dieser Pharmaka gegenüber entzündlichen Ödemen, wobei sich allerdings gewisse Unterschiede hinsichtlich des Wirkungsgrades erkennen lassen.

Eine Ausnahme unter den spezifisch antiphlogistisch wirksamen Stoffen ergab sich für Naftipramid, das wohl in vivo, in vitro aber nur teilweise (bei der ATEE-Hydrolyse) wirksam war.

Unsere Untersuchungen zur Beeinflussung der Formalin-aktivierten Proteolyse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den Befunden von Hardt sowie Mörsdorf (31) bei der Dextran-aktivierten Proteolyse (ausgenommen Aminophenazon), so daß angenommen werden kann, daß bei beiden Entzündungsformen die gleichen gewebs eigenen Proteasen aktiviert werden.

Auf Grund der guten Übereinstimmung zwischen der Wirkungspotenz spezifisch antiphlogistisch wirksamer Pharmaka gegenüber verschiedenen Entzündungsformen und der Hemmbarkeit proteolytischer Prozesse kann die in unserer Untersuchung beschriebene Methode als in-vitro-Test für die Wertbestimmung von Antiphlogistika mit herangezogen werden.

V. Zusammenfassung

Bei der mit Formalin ausgelösten experimentellen Entzündung an der Rattenpfote ließ sich eine deutliche Abhängigkeit der Entzündungsintensität von der Entzündungsdauer nachweisen. Die entzündliche Schwellungsreaktion erreichte vier Stunden nach Formalinapplikation ihr Maximum.

Im Homogenat aus entzündeten Pfoten konnten wir zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entzündungsauslösung im Vergleich zum Homogenat aus nicht entzündeten Pfoten eine Zunahme an Proteolysebruchstücken feststellen, die zur Schwellungsintensität ein annähernd paralleles Verhalten zeigte.

Auch die proteolytische Umsatzrate wies bei in-vitro-Versuchen während der Inkubationszeit für entzündetes Gewebe eine Steigerung gegenüber nicht entzündetem Gewebe auf, die der Schwellungsintensität weitgehend parallel verlief.

Unsere Untersuchungen hinsichtlich der Beeinflussung der Formalin-induzierten Proteolyse durch Pharmaka in vitro zeigten unterschiedliche Ergebnisse.

Die Antiphlogistika Oxyphenbutazon, Phenylbutazon, Natrium-salicylat, Acetylsalicylsäure, Aminophenazon, Indometacin und Flufenamsäure schränkten die proteolytische Aktivität stark ein, während für Mefenamsäure und Naftipramid praktisch kein Hemmeffekt zu beobachten war. Eine nahezu vollkommene Hemmung der Eiweißspaltung in vitro wurde mit Serotonin erzielt.

Alle anderen getesteten Effektoren wie Cortisonacetat, Morphin-Hydrochlorid, Ketobemidon, Epsilon-Aminocaprönsäure, Trasylol^R, Dimethylsulfoxyd und Histamin waren weitgehend unwirksam.

VI. Literaturverzeichnis

1. BÜCH, O.
Zur antiphlogistischen Wirkung von γ -Phenylpropylkarbonat (MH 532), einem neuen zentralen Muskelrelaxans mit Tranquilizer-Eigenschaften
Arch. int. Pharmacodyn., 123, 140-147 (1959)
2. BÜCH, O., MOLNAR, I., WAGNER-JAUREGG, Th.
Antiphlogistische und antipyretische Wirkung von Isoalloxazinderivaten
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 18, C9-C12 (1960)
3. CASADIO, S., Pala, G., MARAZZI-UBERTI, E., COPPI, G.
Alpha-isopropyl-alpha-(2-dimethyl-aminoäthyl)-1-naphthyl-acetamide (DA 992), a new antiinflammatory agent
Experientia, 20, 457 (1964)
4. van CAUWENGERGE, H., LECOMTE, J., LAPIÈRE, G.
Propriétés anti-inflammatoires des deux dérivés de 1'antipyrine
C. R. Soc. Biol., 153, 1292-1294 (1959)
5. CORNELISSEN, G.
Der Einfluß von Antiphlogistika auf ein esterolytisches Fermentsystem, das bei entzündlichen Gewebsreaktionen aktiviert wird
Dissertation, Med. Fak., Bonn 1966
6. DOMENJOZ, R.
Pharmakotherapeutische Weiterentwicklung der Antipyretika-Analgetika
Arch. exp. Path. u. Pharmacol., 225, 14-42 (1955)

7. DOMENJOZ, R.
The Pharmacology of Phenylbutazone Analogues
Ann. N.Y. Academy of Sciences 86, 263-291 (1960)
8. DOMENJOZ, R., MÖRSDORF, K.
Rat paw oedema induced by proteolytic enzymes as a
test for the evaluation of inflammatory agents
Proc. of an Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflammatory drugs, Milan 1964; Excerpta med. Intern. Congress
Series No 82, 162-173
9. DOMENJOZ, R., THEOBALD, W., MÖRSDORF, K.
Die Beeinflussung der an der Ratte gleichzeitig gesetz-
ten Formalin- und Dextranentzündung
Arzneimittelforsch., 5, 488-489 (1955)
10. DOMENJOZ, R., MÖRSDORF, K., STENGER, E.G., THEOBALD, W.
Zur entzündungshemmenden Wirkung von Natriumsalicylat
Ann. Univ. Sarav. Med., 2, 302-312 (1955)
11. DONNER, I.
Die Aktivierung esterolytischer Prozesse bei der experi-
mentellen Entzündung
Dissertation, Med. Fak., Bonn 1966
12. FRANCHIMOANT, P., LECOMTE, J., van CAUWENBERGE, H.
Influence de la sérotonine et d'un de ses antagonistes
sur le développement des réactions oedémateuses locales
provoquées chez le Rat par divers agents
C. R. Soc. Biol., 155, 180-184 (1961)

13. GARATTINI, S., JORI, A., BERNARDI, D., CARRARA, C.,
PAGLIALUNGA, S., SERGE, D.
Sensitivity of local oedemas to systemic pharmacological effects
Proc. of an Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflammatory drugs, Milan 1964; Excerpta med. Intern. Congress
Series No 82, 151-161
14. GEORGES, G., HEROLD, M.
Influence of 5-hydroxytryptamine on oedema of the foot
provoked by dextran in the rat
C. R. Soc. Biol., 151, 695-698 (1957)
15. GROSS, F.
Unspezifische Beeinflussung entzündlicher Reaktionen
Schweiz. med. Wschr., 80, 697-701 (1950)
16. HARDT, D.
Beeinflussung der bei der Dextranentzündung aktivierten
Proteasen durch Antiphlogistika in vitro
Dissertation, Med. Fak., Bonn 1967
17. HEILMEYER, L., KÄHLER, H.J.
Die Entzündung und ihre Steuerung
Benno Schwabe & Co
Basel/Stuttgart 1962
18. HILLEBRECHT, J.
Zur routinemäßigen Prüfung antiphlogistischer Substanzen
im Rattenpotentest
Arzneimittelforsch., 4, 607-614 (1954)
19. HLADOVEC, J., RYBAK, M.
A specific esterase in experimental inflammation
Biochem. Pharmacol., 12, 1058-1061 (1963)

20. HLADOVEC, J., RYBAK, M.
To the mechanism of anti-inflammatory effects of the
protease inhibitor isolated from potatoes
Biochem. Pharmacol., 12 Suppl. 173-174 (1963)
21. HLADOVEC, J., HORAKAVA, Z., MANSFELD, V.
Antiphlogistische Wirkungen vom Proteasen-Inhibitor
aus Kartoffeln auf verschiedene Typen der experimen-
tellen Entzündung
Arch. int. Pharmacodyn., 128, 343-354 (1960)
22. KALBHEN, D.A.
Bestimmung der freien Aminosäuren im gesunden und
entzündeten Pfortengewebe der Ratte
Arch. int. Pharmacodyn., 143, 337-361 (1963)
23. KALBHEN, D.A., DOMENJOZ, R.
Zeitlicher Verlauf der Schwellung und der Konzentration
an freien Aminosäuren nach lokaler Injektion von Trypsin
Med. Pharm. Exp., 15, 97-101 (1966)
24. KALLER, H.
Die Beeinflussung experimentell erzeugter Ödeme durch
Trasylol
in: Neue Aspekte der Trasylol Therapie
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1965
25. KELEMEN, E.
zit. nach Theobald
26. LACK, Ch.H.
Proteolytic activity and connective tissue
Brit. Med. Bulletin, 20, 217-222 (1964)

27. LAPIERE, C., LECOMTE, J., van CAUWENBERGE, H.
Sur les inhibiteurs de l'oedème provoqué par le formol
C. R. Soc. Biol., 153, 1088-1090 (1959)
28. MENKIN, V.
zit. nach Heilmeyer u. Kähler
29. MENKIN, V.
Modern views on inflammation
Int. Arch. Allergy, 4, 131-168 (1953)
30. MÖRSDORF, K.
Untersuchungen über die Bedeutung des Serotonins
(5-Hydroxytryptamin) als möglichem Mediator der
experimentellen Entzündung bei der Ratte
Habilitationsschrift, Med. Fak., Bonn 1961
31. MÖRSDORF, K.
The influence of antiphlogistics on tissue proteases
Proc. of an Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflam-
matory drugs, Milan 1964; Excerpta med. Intern. Congress
Series No 82, 85-89
32. MÖRSDORF, K.
Proteolytische und esterolytische Prozesse im entzündeten
Gewebe
in: Die Entzündung
Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung
Intern. Symp., Freiburg/Breisgau 1966, 152-157
Verlag Urban & Schwarzenberg München/Berlin/Wien

33. PARKES, M.W., WRIGHLEY, F.
The effect of A.C.T.H., Cortison, and D.C.A. with
ascorbic acid on "Formalin-arthritis"
Brit. med. J., 1951/I, 670-675
34. RICK, W.
Trypsin, in Bergmeier, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim, 807-818 (1962)
35. SCHULZ, F.
Über ein biologisch hochactives Polypeptid,
den Kallikrein-Inhibitor (Trasylol^R)
in: Medizin und Chemie (Farbenfabriken Bayer, Ed.)
36. THEOBALD, W.
Vergleichende Untersuchungen mit anti-inflammato-
rischen Wirkstoffen am Formalinödem
Arch. int. Pharmacodyn., 103, 17-26 (1955)
37. UNGAR, G.
The fibrinolytic system and inflammation
in: The mechanism of inflammation
An International Symposium
Medical Publishers Acta, ING Montreal 1953)
38. UNGAR, G., DAMGAARD, E., HUMMEL, F.P.
Action of salicylates and relates drugs on inflam-
mation
Am. J. Physiol., 171, 545-553 (1952)
39. WEIS, J.
Investigations on some experimental inflammations
in mouse paws
Med. Exp. 8, 1-11 (1963)

40. WILHELMI, G.

zit. nach Hillebrecht

41. WILHELMI, G., PULVER, R.

Untersuchungen zur Frage eines peripheren Angriffspunktes der Pyrazole bei der antiphlogistischen Wirkung

Arzneimittelforsch., 5, 221-224 (1955)

42. WINTER, C.A.

Anti-inflammatory testing methods: Comparative evaluation of indomethacin and other agents

Proc. of an Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflammatory drugs, Milan 1964; Excerpta Med. Intern. Congress Series 82, 190-202

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmakologischen Institut der Universität Bonn unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. K. Mörsdorf durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. R. Domenjoz, Direktor des Pharmakologischen Institutes, danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Herrn Prof. Dr. med. Mörsdorf bin ich zu ganz besonderem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas und seine unermüdlichen Bemühungen um die Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Als Sohn des Zahnarztes Dr. Hubert Schulze und seiner Ehefrau Maria, geb. Samson, wurde ich am 23. 9. 1940 in Paderborn geboren.

Nach Absolvierung der Grundschule in Niedermarsberg besuchte ich das dortige Progymnasium. Ostern 1957 wechselte ich in das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Willingen/Waldek über, wo ich im Februar 1960 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer 1960 begann ich in Hamburg mit dem Studium der Zahnheilkunde, das ich im Sommer 1963 in Bonn fortsetzte. Hier bestand ich im Herbst 1963 mein Physikum und am 14. Juli 1966 mein Staatsexamen.

